

Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid- Bagian 1: Metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT - PCR)



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

| | |
|--|----|
| Daftar isi..... | i |
| Prakata | ii |
| 1 Ruang lingkup..... | 1 |
| 2 Istilah dan definisi | 1 |
| 3 Prinsip..... | 2 |
| 5 Peralatan | 2 |
| 6 Bahan | 3 |
| 7 Prosedur | 3 |
| 8 Interpretasi hasil | 6 |
| Lampiran A (normatif) Pembuatan pereaksi | 8 |
| Lampiran B (informatif) Diagram alur prosedur deteksi IMNV dengan metode <i>reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i> (RT-PCR) | 9 |
| Lampiran C (normatif) Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan TRIzol | 10 |
| Lampiran D (normatif) Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan dengan kit IQ-2000 | 12 |
| Bibliografi | 13 |
| Gambar 1 – Hasil deteksi IMNV dengan metode RT - PCR..... | 7 |
| Gambar 2 – Teknik diagnosa menggunakan kit IQ-2000 | 7 |
| Gambar B.1 – Diagram alur prosedur deteksi IMNV dengan metode RT-PCR..... | 9 |
| Tabel 1 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk RT-PCR | 4 |
| Tabel 2 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk <i>nested</i> -PCR | 5 |
| Tabel 3 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk proses amplifikasi RT - PCR..... | 6 |
| Tabel 4 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk proses amplifikasi <i>nested</i> -PCR..... | 6 |

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid- Bagian 1: Metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT - PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat – rapat teknis serta terakhir disepakati dalam konsensus pada tanggal 24 Juni 2010 di Bandung, dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan :

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Januari 2011 sampai dengan 25 Maret 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid - Bagian 1: Metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT - PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid dengan menggunakan metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT - PCR).

2 Istilah dan definisi

2.1

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari DNA virus berdasarkan pada reaksi enzim *polymerase* secara berantai

2.2

annealing

proses perlekatan antara primer dan *template*

2.3

asam nukleat

bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya yang dapat berupa asam *deoksiribonukleat* (DNA) atau asam *ribonukleat* (RNA)

2.4

denaturasi

proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA

2.5

diagnosa

metode diagnosa yang diakui secara internasional

2.6

ekstension

proses pembentukan DNA baru

2.7

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik virus dari jaringan atau sel

2.8

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

2.9

hemolymph

cairan darah yang bercampur limfe pada udang

2.10

***infectious myonecrosis virus* (IMNV)**

IMNV diperkirakan adalah totivirus yang merupakan anggota dari *family* totiviridae

2.11

metode yang direkomendasikan

metode yang terbaik dilihat dari segi ketersediaan, kegunaan (*utility*), dan kemampuan spesifisitas serta sensitifitasnya

2.12

penyakit viral

penyakit yang disebabkan oleh virus.

2.13

persiapan contoh

proses persiapan organ untuk pemeriksaan RT - PCR

2.14

polipeptida

rangkaian *peptida* (rantai asam amino) yang membentuk protein

2.15

syringe

alat untuk menyuntikan cairan ke dalam atau menyedotnya dari berbagai pembuluh atau rongga

2.16

RNA

asam ribonukleat, merupakan transkripsi DNA, RNA terdapat di dalam inti sel dan sitoplasma

2.17

RT-PCR

proses PCR yang didahului dengan sintesis DNA dari RNA menggunakan enzim transkrip balik (*reverse transcriptase*)

3 Prinsip

Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) dengan metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT - PCR) pada udang penaeid

4 Metode yang direkomendasikan

Untuk tujuan pembuktian bebas dari IMNV, dianjurkan menggunakan uji histopatologi (melihat badan inklusi dan nekrosis koagulatif) dan RT - PCR.

5 Peralatan

- a) Peralatan elektroforesis;
- b) *freezer* (suhu - 20 °C).
- c) mikropipet;
- d) mikrotube ukuran 1,5 ml dan 0,2 ml;
- e) *microwave/hot plate*;
- f) *mini mixer*;
- g) *pellet pestle/ tissue rupture*;
- h) peralatan bedah, terdiri dari: *pinset*, gunting, dan *scalpel*;
- i) peralatan dokumentasi;
- j) sentrifus;

- k) timbangan analitik;
- l) *thermocycler*;
- m) *uv transilluminator*;
- n) *waterbath/heating block*.

6 Bahan

- a) *Low agarose*;
- b) *TRIzol*
- c) *Chloroform*
- d) Isopropanol
- e) akuabides;
- f) alkohol absolut;
- g) *buffer TE* (100 mM *tris*-HCl, 10 mM EDTA)/ EDTA;
- h) *ethidium bromide* (10 mg/ml);
- i) formula PCR: (2x *mastermix* RNA; AMV RT; *Nucleus free water*)
- j) *marker* (100 bp DNA *ladder*);
- k) primer:
 - *first step* PCR : IMNV F = 5' CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA-3'
 - IMNV R = 5' ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT-3'
 - *nested* PCR : IMNV NF = 5' GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA-3'
 - IMNV NR = 5' AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G-3'
- l) 0,5 x *buffer TAE* Buffer
- m) DEPC - *treated water* ddH₂O
- n) 6 x *loading dye* mengandung pewarna *bromphenol blue*;

CATATAN Pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

7 Prosedur

7.1 Metoda konvensional

7.1.1 Persiapan contoh

- a) Contoh udang untuk pengujian IMNV dapat berupa organ udang terutama pada bagian *pleopod*, *hemolymph*, ekor dan insang baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan gliserol dan alkohol absolut dengan perbandingan 20 : 80 atau RNA *latter*.
- b) RNA *extraction* menggunakan *high pure RNA tissue kit*, prosedur ekstraksi RNA dapat dilihat pada *manual kit* yang digunakan. Untuk pelarut RNA digunakan RNase-free water.
- c) Panaskan RNA selama 3 menit.

7.1.2 Ekstraksi RNA menggunakan *TRIzol*

- a) Masukkan jaringan sebanyak 25 mg - 75 mg kedalam mikrotube dan tambahkan 150 µl *TRIzol* kemudian digerus, setelah hancur tambahkan lagi 850 µl *TRIzol* atau 250 µl *hemolymph* dan tambahkan 750 µl *TRIzol* kemudian dicampur dengan baik dan kuat selama 20 detik.
- b) Inkubasikan pada suhu 25 °C selama 5 menit.
- c) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g (r = 6 cm) selama 10 menit pada suhu 25 °C.
- d) Pindahkan supernatan kedalam mikrotube baru (pada step ini supernatan dapat disimpan pada suhu - 70 °C selama ± 1 bulan).

- e) Tambahkan supernatan tersebut dengan 200 µl *chloroform*, kemudian campurkan dengan baik selama 20 detik.
- f) Inkubasikan pada suhu 25 °C selama 10 menit.
- g) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g (r = 6 cm) selama 10 menit pada suhu 25 °C.
- h) Pindahkan supernatan pada mikrotube yang baru dan tambahkan 670 µl isopropanol (untuk pemakaian 1000 µl *TRIzol*) kemudian dicampurkan.
- i) Inkubasikan pada suhu 25 °C selama 10 menit (- 20 °C atau - 70 °C selama 1 jam).
- j) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g (r=6 cm)) selama 10 menit pada suhu 25 °C.
- k) Buang supernatannya, endapan putih (*pellet*) berupa RNA, kemudian cuci dengan 500 µl 70 % etanol** selama ± 30 menit pada suhu 25 °C, sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g (r=6 cm) selama 10 menit pada suhu 25 °C.
- l) Buang supernatannya, kering-anginkan *pellet* RNA selama ± 20 menit, untuk penyimpanan lama : tambahkan 95% etanol **.
- m) Setelah kering tambahkan larutan 150 µl EDTA* untuk 50 mg jaringan dan 75 µl EDTA* untuk 250 µl *hemolymph*.

CATATAN 1 * Larutan EDTA : 0,1 mM EDTA dengan SW.
SW : 0,1 % (v/v) dalam akuades, di *stirrer overnight* kemudian di *autoclave* 121 °C, selama 1 jam.

CATATAN 2 ** 70 % dan 95 % etanol : sebagai bahan pencampur gunakan SW.

CATATAN 3 Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan *TRIzol* digambarkan pada Lampiran C.

7.1.3 Amplifikasi

7.1.3.1 RT-PCR

- a) Primer dengan target berat molekul 328 bp. Adapun susunan primernya sebagai berikut:
IMNV-F (5'-CGA CGC TGC TAA CCA TAC AA-3')
IMNV-R (5'-ACT CGG CTG TTC GAT CAA GT-3')
- b) Kemampuan *first step* ini dapat mendeteksi minimal 100 *copy* RNA.
- c) Siapkan 25 µl per contoh larutan *mastermix* untuk RT-PCR.
- d) Kondisi siklus untuk RT- PCR :

Tabel 1 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk RT-PCR

| Proses | Suhu (°C) | Waktu (detik) | Siklus |
|------------------------------|------------|----------------------------------|--------|
| <i>Reverse transcriptase</i> | 60 95 | 1800 (30 menit) 120 (2 menit) | 1 x |
| Denaturasi | 95 | 45 | 39 x |
| <i>Annealing/Extension</i> | 60 | 45 | 39 x |
| <i>Final Extension</i> | 60 | 7 | 1 x |

7.1.3.2 Nested DNA-PCR

- a) Primer nested DNA yang digunakan mempunyai target berat molekul 139 bp dengan susunan sebagai berikut:
IMNV-NF (5'-GGC ACA TGC TCA GAG ACA-3')
IMNV-NR (5' -AGC GCT GAG TCC AGT CTT G-3')
- b) Siapkan 25 µl per contoh larutan *mastermix* untuk *nested* - PCR.
- c) Jalankan amplifikasi dengan kondisi siklus:

Tabel 2 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk *nested-PCR*

| Proses | Suhu (°C) | Waktu (detik) | Siklus |
|------------------------|------------|---------------|--------|
| Pre denaturasi | 95 | 120 (2 menit) | 1 x |
| Denaturasi | 95 | 30 | 39 x |
| <i>Annealing</i> | 65 | 30 | 39 x |
| <i>Extension</i> | 72 | 30 | 39 x |
| <i>Final extension</i> | 72 | 120 (2 menit) | 1x |

7.1.4 Elektroforesis

- Campurkan 10 µl PCR produk amplifikasi dengan 2 µl 6 x *loading dye*.
- Masukkan pada 2 % *agarose gel* menggunakan 1 x TAE *buffer*.
- Running* selama 15 menit - 20 menit dengan kekuatan 100 volt.
- Marker* (penanda) yang digunakan adalah 100 bp DNA *ladder*.
- Hasil elektroforesis diwarnai dengan 0,5 mg/ml *ethidium bromide* dalam larutan penyangga 1 x TAE selama lebih dari 15 menit di tempat gelap.

7.2 Teknik diagnosa dengan *kit IQ-2000*

7.2.1 Ekstraksi

- Masukkan 20 mg - 25 mg contoh ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- Gerus contoh menggunakan *pellet pestle*, tambahkan 500 µl RNA *extraction solution* dan biarkan pada suhu 25 °C selama 5 menit.
- Tambahkan 100 µl CHCl₃ (Chloroform), lalu homogenkan dengan *vortex mini mixer* selama 20 detik. Biarkan pada suhu ruang selama 3 menit, lalu disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm (r=7 cm) selama 15 menit.
- Pindahkan 200 µl supernatan ke dalam mikrotube 0,5 ml baru yang telah diisi dengan 200 µl isopropanol.
- Dihomogenkan dengan *vortex* sebentar, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm (r=7 cm) selama 10 menit, lalu buang sisa isopropanol.
- Cuci *pellet* dengan 0,5 ml alkohol 70 %, lalu disentrifus dengan kecepatan 9.000 rpm (r=7 cm) selama 5 menit, lalu buang sisa alkohol dan keringkan *pellet*.
- Pellet* dilarutkan dengan DEPC - *treated water* ddH₂O 0,1 % sebanyak 50 µl.

CATATAN Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan dengan *kit IQ-2000* digambarkan pada Lampiran D.

7.2.2 Amplifikasi

7.2.2.1 RT-PCR

- Buat *mastermix* untuk RT-PCR, sediakan tiga buah kontrol positif dan satu kontrol negatif.

| | |
|-------------------------------|----------|
| First mix : IMNV <i>First</i> | : 7 µl |
| RT PCR | : 0.5 µl |
| IQ <i>Enzym</i> | : 0.5 µl |
| <i>Template</i> | : 1 µl |

| | |
|--------------------------|----------|
| Nested mix : Nested IMNV | : 14 µl |
| IQ <i>Enzym</i> | : 0.5 µl |
- Operasionalkan amplifikasi dengan kondisi seperti pada Tabel 3.

Tabel 3 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk proses amplifikasi RT - PCR

| Suhu (°C) | Waktu | Siklus |
|------------|----------|--------|
| 43 | 30 menit | 1 x |
| 94 | 2 menit | 1 x |
| 94 | 20 detik | 15 x |
| 62 | 20 detik | 15 x |
| 72 | 30 detik | 15 x |
| 72 | 30 detik | 1 x |
| 20 | 30 detik | 1 x |

7.2.2.2 Nested-PCR

- Masukkan 15 μ l *mastermix nested* PCR ke dalam tabung yang berisi seluruh pereaksi RT-PCR.
- Operasionalkan amplifikasi dengan kondisi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk proses amplifikasi *nested*-PCR

| Suhu (°C) | Waktu | Siklus |
|------------|----------|--------|
| 94 | 20 detik | 30 x |
| 62 | 20 detik | 30 x |
| 72 | 30 detik | 30 x |
| 72 | 30 detik | 1 x |
| 20 | 30 detik | 1 x |

7.2.3 Elektroforesis

- Campur 8 μ l hasil amplifikasi dengan 2 μ l *loading dye*.
- Masukkan dalam sumuran pada *agarose gel* 2 %.
- Marka DNA yang digunakan adalah yang disediakan *kit* atau DNA 100 bp *ladder*.
- Running* dengan voltase 100 volt - 150 volt selama 20 menit.
- Hasil elektroforesis diwarnai dengan 0,5 mg/ml *ethidium bromide* dalam larutan penyangga 1 x TAE selama lebih dari 15 menit di tempat gelap.

8 Interpretasi hasil

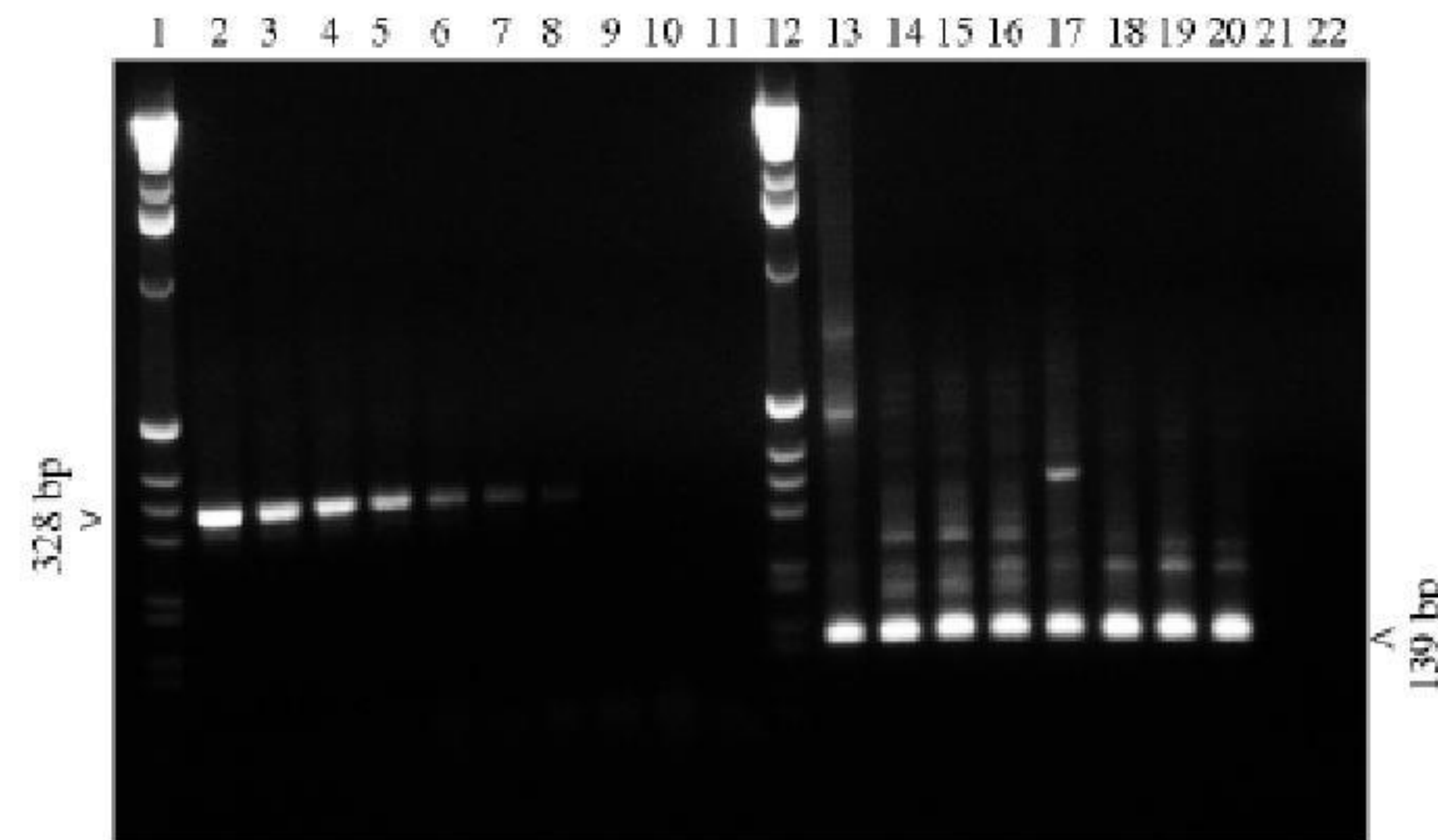
8.1 Metoda konvensional

8.1.1 RT - PCR

- Contoh dinyatakan positif IMNV jika menghasilkan pita berukuran 328 bp.

8.1.2 *Nested* PCR

- Contoh dinyatakan positif IMNV jika menghasilkan pita berukuran 139 bp.



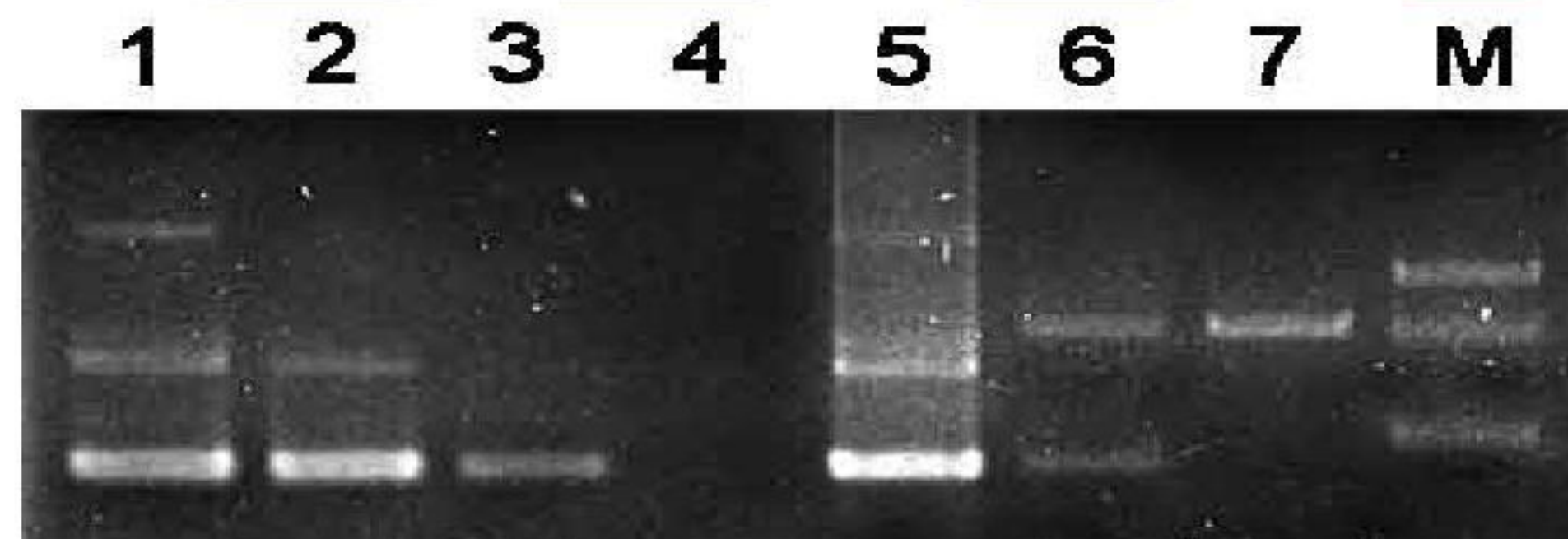
Keterangan gambar :

Penentuan sensitivitas uji RT-PCR, yang diekstrak dari IMNV yang dimurnikan, mulai dari 10^8 kopi. Lane 1 dan 12 berisi *marker* dengan berat molekul 1 kbp. Lane 2 - 10 berisi hasil dari *first step* RT-PCR dengan 10^8 kopi dan diakhiri dengan 1 kopi per reaksi. Lane 8 dengan 100 kopi, lane 11 tidak berisi hasil dari *first step* RT-PCR. Lane 12 sampai 21 berisi produk dari *nested* RT-PCR.

Gambar 1 - Hasil deteksi IMNV dengan metode RT - PCR

8.2 Teknik diagnosa dengan *kit* IQ-2000

- Contoh dinyatakan negatif IMNV jika hanya menghasilkan pita berukuran 680 bp (kontrol internal).
- Contoh dinyatakan positif ringan jika menghasilkan pita berukuran 255 bp dan/atau 680 bp
- Contoh dinyatakan positif berat jika menghasilkan pita berukuran 255 bp dan/atau 510 bp.



Keterangan gambar :

Lane 1: IMNV kontrol positif, 2000 kopi atau reaksi
 Lane 2: IMNV kontrol positif, 200 kopi atau reaksi
 Lane 3: IMNV kontrol positif, 20 kopi atau reaksi
 Lane 4: kontrol negatif (*yeast* tRNA atau ddH₂O)
 Lane 5: contoh terdeteksi terinfeksi IMNV
 Lane 6: contoh terdeteksi terinfeksi IMNV ringan
 Lane 7: contoh negative IMNV
 Lane M: *marker* (848 bp, 630 bp, 333 bp)

Gambar 2 - Teknik diagnosa menggunakan kit IQ-2000

Lampiran A (normatif) Pembuatan pereaksi

A.1 Mastermix untuk RT-PCR (25 µl reaksi/contoh):

- 1 x EZ *buffer*;
- dNTP masing-masing 300 µM
- *primer first step* masing-masing 0,465 µM
- *manganese acetate* 2,5 mM
- 2,5 U rTth DNA *polymerase*
- RNA *template* (yang sudah dipanaskan selama 3') 1 µl - 5 µl

A.2 Mastermix untuk *nested*-PCR (PuRe *tag ready-to-go bead*; 25 µl reaksi/contoh):

- dNTP masing-masing 200 µM
- *magnesium chloride* 1,5 mM
- 2,5 U PuRe taq DNA *polymerase*
- *primer nested* masing-masing 0,465 µM
- larutan dari *first step* PCR (RT-PCR) 0,5 µl

A.3 Mastermix RT-PCR IQ2000:

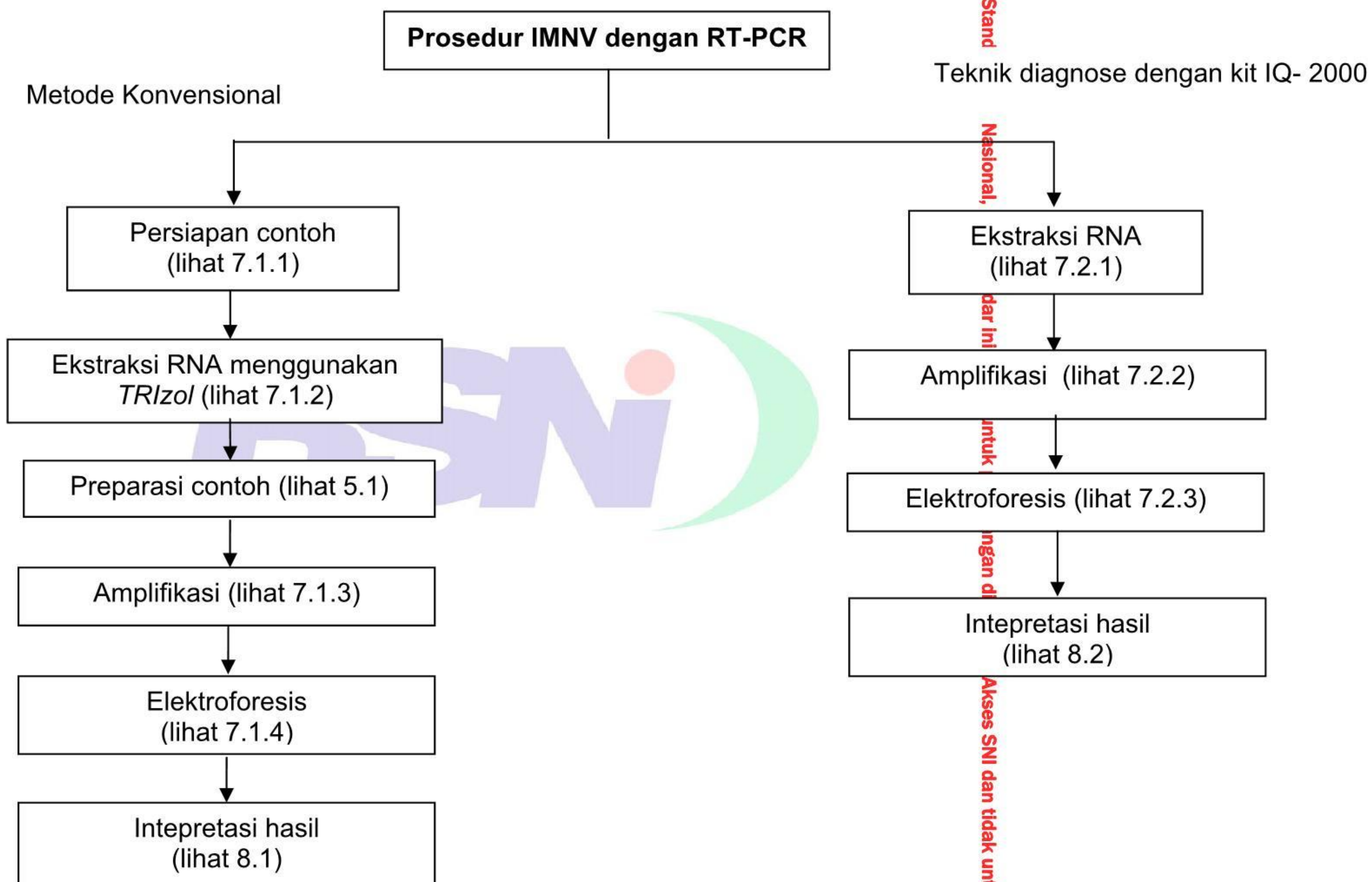
- RT-PCR *PreMix* 7 µl
- IQzyme DNA *polymerase* 0,5 µl
- RT *enzyme mix* 0,5 µl
- RNA hasil ekstraksi 2 µl

A.4 Mastermix *nested* PCR IQ 2000:

- *nested* PCR *PreMix*: 14 µl
- IQzyme DNA *polymerase* (2U/µl) 1 µl

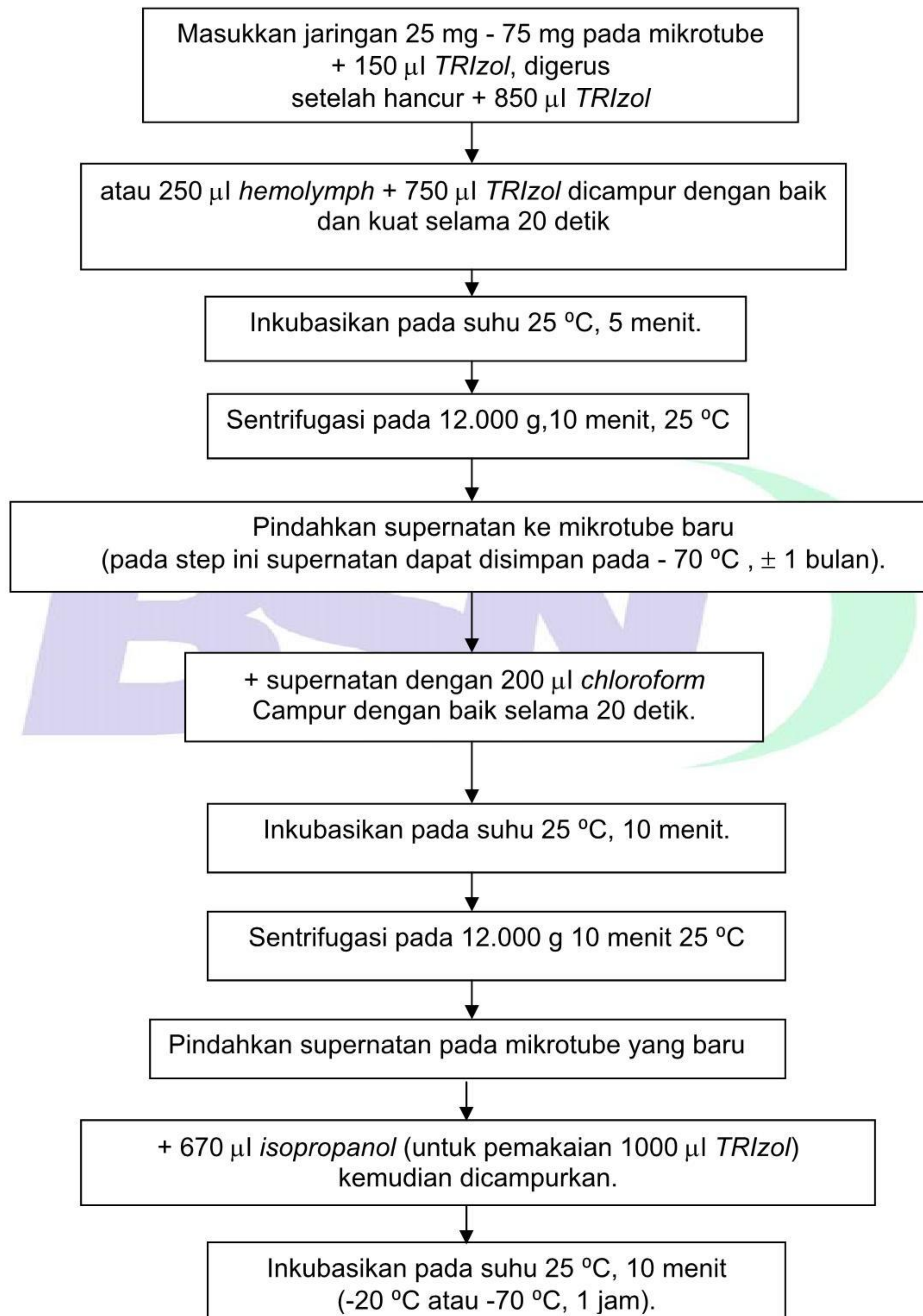
Lampiran B
(informatif)

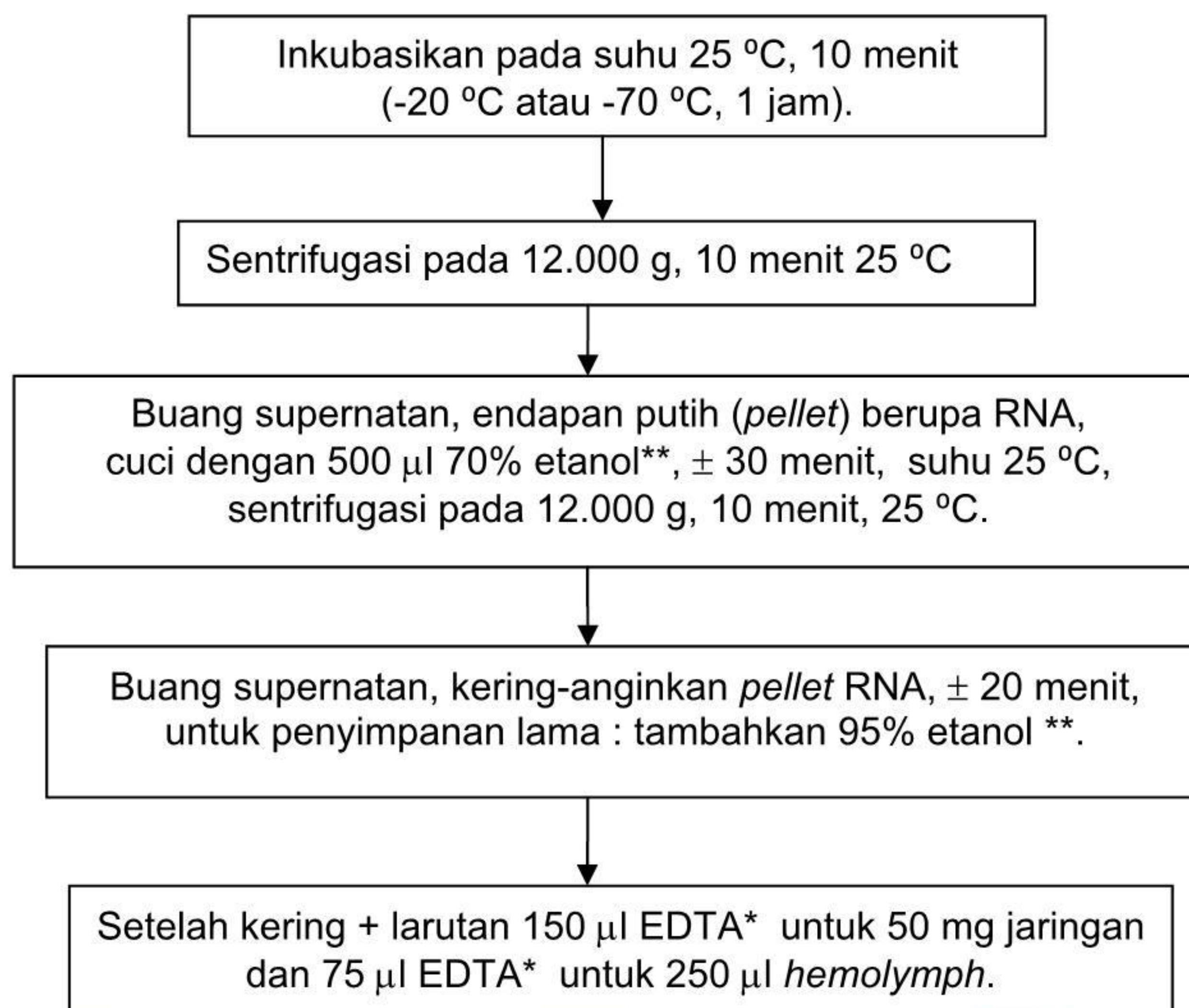
Diagram alur prosedur deteksi IMNV dengan metode *reverse transcriptase - polymerase chain reaction* (RT-PCR)



Gambar B.1 – Diagram alur prosedur deteksi IMNV dengan metode RT-PCR

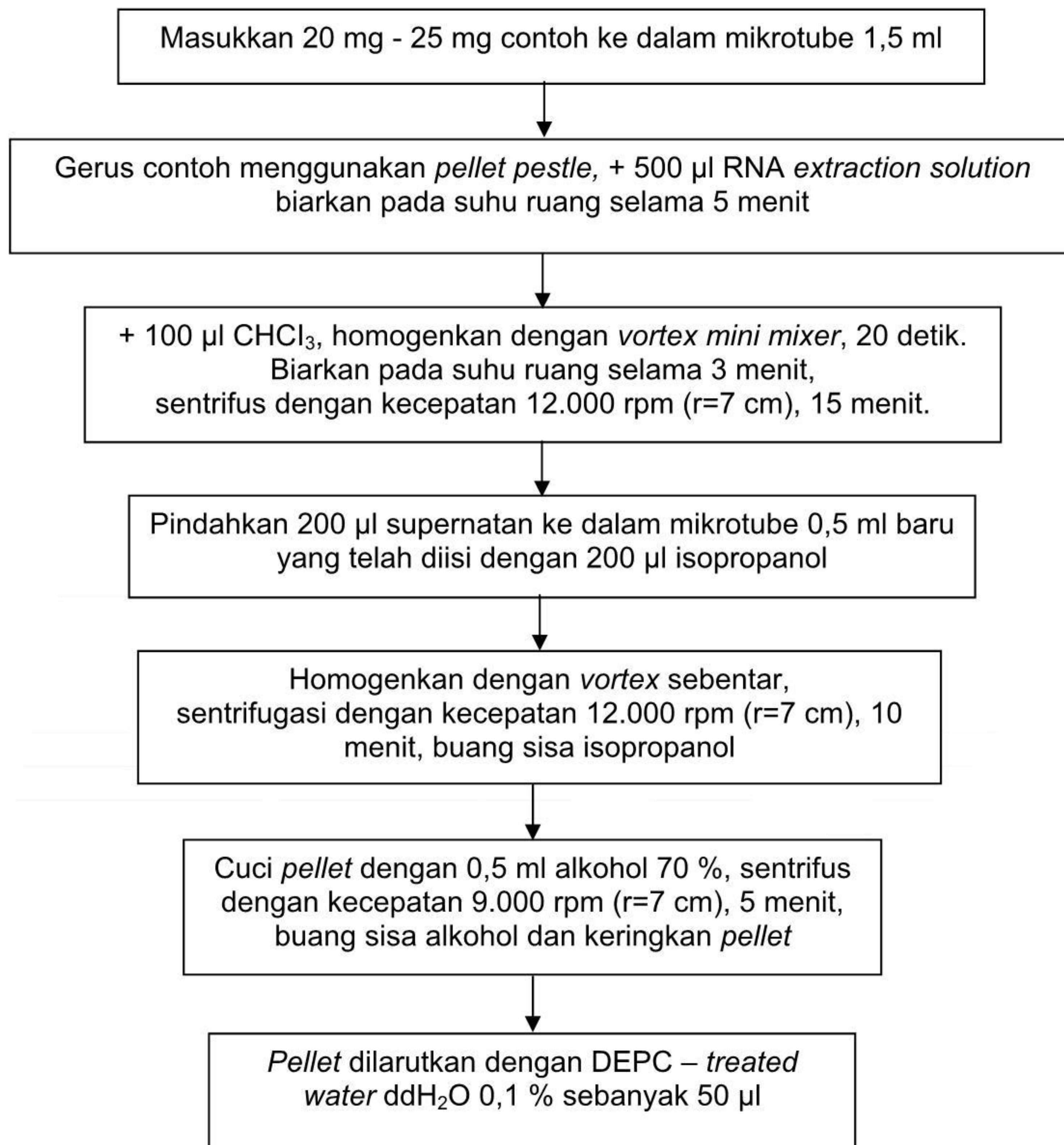
Lampiran C
(normatif)
Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan TRIzol





Gambar B.1- Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan TRIzol

Lampiran D
(normatif)
Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan dengan kit IQ-2000



Gambar D.1- Diagram alur ekstraksi RNA menggunakan dengan *kit* IQ-2000

Bibliografi

Poulos B.T & DV Lightner. 2006. Detection of *infectious myonecrosis virus* (IMNV) of *penaeid shrimp* by *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *Dis Aquat Org* 73: 69 - 72

Poulos: B.T., K.F.J. Tang, C.R. Pantoja, J.R. Bonami and D.V. Lightner. 2006. *Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp*. *Journal of General Virology*, 87: 987-996

Pusat Karantina Ikan. 2008. *Metode Standar Pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Virus*. Jakarta. pp 27.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id